

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030013795 A
 (43)Date of publication of application: 15.02.2003

(21)Application number: 1020010047981
 (22)Date of filing: 09.08.2001

(71)Applicant: BIO DREAMS CO., LTD.
 (72)Inventor: KIM, NAM GYU
 PARK, HAE JUN

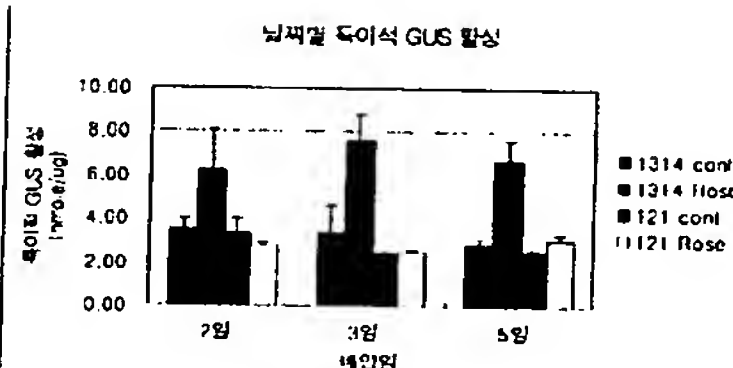
(51)Int. Cl. C12N 15 /29

(54) NEW INDUCER FOR THE EXPRESSION OF POD PROMOTER

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is an elicitor extracted from fugal isolated BDF-1 strain and used as an inducer for the expression of POD(peroxidase) promoter, thereby increasing the production of gene products of the medicinal protein inserted into the POD promotor, and producing medicinal proteins and useful material in high yield with low production cost.

CONSTITUTION: The POD promotor expression inducer contains as main ingredient the elicitor extracted from the hyphal wall component(HWC) of a novel strain BDF-1(KCTC 1002BP), wherein POD is originated from sweet potatoes. The activity of the POD promotor in tobacco cells transformed with a vector including it is increased by treating the elicitor.



copyright KIPO 2003

Legal Status

Date of request for an examination (00000000)
 Notification date of refusal decision (00000000)
 Final disposal of an application (application)
 Date of final disposal of an application (00000000)
 Patent registration number ()
 Date of registration (00000000)
 Number of opposition against the grant of a patent ()
 Date of opposition against the grant of a patent (00000000)
 Number of trial against decision to refuse ()
 Date of requesting trial against decision to refuse ()

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
C12N 15/29

(11) 공개번호 특2003-0013795
(43) 공개일자 2003년02월15일

(21) 출원번호 10-2001-0047981
(22) 출원일자 2001년08월09일

(71) 출원인 (주)바이오드림스
대전광역시 유성구 어은동52생명공학연구소비브이씨204호
(72) 발명자 박해준
대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 206-305
김남규
대전광역시중구산성동303-28
(74) 대리인 김원준

심사청구 : 없음

(54) P O D 프로모터의 발현시스템 유도제

요약

본 발명은 장미에 공생 또는 기생하는 균주인 BDF-1으로부터 추출한 엘리시터를 POD 프로모터의 발현시스템 유도제로 이용하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의한 엘리시터를 이용함으로써 POD 프로모터에 삽입한 의약단백질 유전자 산물의 생산을 증가시키고, 고수율, 고생산, 저비용의 의약단백질 및 유용물질을 생산할 수 있을 것이다.

대표도

도 1

색인어
엘리시터, POD 프로모터, 활성화

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 의한 유도제를 처리한 담배세포의 배양일수에 따른 GUS 활성을 측정한 그래프.

도 2는 본 발명에 의한 유도제의 처리 농도에 따른 GUS 활성의 변화를 나타낸 그래프.

도 3은 본 발명에 의한 유도제 및 타 유도제의 처리에 따른 GUS 활성을 측정한 그래프.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 BDF-1 균주로부터 추출한 엘리시터를 이용한 POD 프로모터의 발현시스템 유도제에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 장미에 공생 또는 기생하는 균주인 BDF-1으로부터 추출한 엘리시터를 주요성분으로 하는 POD 프로모터의 발현시스템 유도제에 관한 것이다.

최근 의약품단백질을 생산하는 유전자들을 도입한 형질전환식물체를 통하여 백신, 호르몬, 사이토키닌 등의 고가 의약품들을 생산하는 기술이 대두되고 있다.

기존의 개념 및 방법에 의하면 이종의 유용단백질 생산을 위해서 가장 흔히 사용되는 방법은 세균이나 효모 등에서 이루어져 왔으나, 최근 식물체 및 식물세포에 대한 연구가 많이 이루어져 식물을 조작하기 위한 기술들이 많이 확보되었다. 특히, 최근 한국생명공학연구원에서 식물의 산화스트레스에 의해 유도되는 POD(peroxidase) 프로모터를 개발함으로써 백신, 호르몬과 같은 고가의 의약품들을 값싸게 얻을 수 있는 계기를 마련하게 되었다. 일반적으로 형질전환 식물에서 생산되는 의약품 단백질은 동물배양세포 등에 의해 생산되는 것보다 생산에 사용되는 비용이 아주 낮아 경제적이다.

한편, 식물체에 비병원성균에 의해 분리되는 일부의 엘리시터(elicitor) 물질을 처리하게 되면 일종의 식물의 저항성 유도를 위한 인식반응으로서, 활성산소가 일정한 패턴을 가지면서 생성되어 이차 messenger로서 작용한다. 이러한 작용에 의하여 POD가 대량으로 발현되고 경시적으로 처리조직 뿐만 아니라 전신적으로 순차적 발현을 한다.

엘리시터형 유도제를 POD 프로모터 형질전환식물에 사용할 경우 유용한 외래 단백질을 대량생산할 수 있으며, 일반적인 산화스트레스에 비하여 식물체에 극단적인 괴사반응을 주지 않아 생산수율을 높일 수 있다는 장점을 지닌다.

국내외적으로 엘리시터를 유도제로 사용하여 식물의 유용생산물, 특히 2차 대사산물을 얻는 연구가 많이 이루어지고 있다. 그러나, 형질전환식물체에서는 아직 유용소재 생산을 증가시키기 위한 엘리시터 처리 실험은 이루어지지 않고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 BDF-1 균주로부터 추출한 엘리시터를 POD 프로모터 발현시스템의 유도제로 사용하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는 신균주인 BDF-1 균주로부터 획득한 엘리시터를 이용한다. 또한 본 발명에서 사용한 POD 프로모터는 고구마 유래의 것이다. 상기 POD 프로모터는 한국생명공학연구원의 곽상수 박사팀이 고구마에서 분리한 것으로 저온 및 산화스트레스에서 상기 프로모터 시스템에 삽입된 유전자의 유전자산물을 대량 발현시킬 수 있는 특징을 지닌다. 상기 프로모터 시스템은 기존의 CaMV35s 프로모터 시스템보다 더 우수한 발현시스템으로 인정받고 있다.

상기 POD프로모터로 형질전환된 담배세포에 처리할 엘리시터는 균주로부터 추출한 것으로, 이 균주는 대전시 소재의 장미(*Rosa spp.*) 재배 비닐 하우스에서 장미에 공생 내지는 기생하는 것으로 보이는 균류에서 단균사 분리법에 의해 분리된 균주이다. 상기 균주는 Fungi Isolated BDF-1(이하 'BDF-1'이라 함)이라 임시로 명명하고 2001년 4월 24일에 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 1002BP로 기탁하였다.

BDF-1 균주에서 추출한 엘리시터는 균체벽성분(hyphal wall component, HWC)으로서, 현재까지 가장 우수하다고 알려진 역병병균의 HWC보다 많은 활성산소 및 파이토알렉신을 유도하는 특성을 보인다(한국 특허 출원번호 10-2001-0030896).

본 발명에서는 POD프로모터에 GUS(beta-glucuronidase) 유전자를 삽입한 벡터로 형질전환된 담배세포에서 발현된 GUS의 활성을 측정함으로써 엘리시터 처리에 의한 POD 프로모터 활성을 확인한다. 전기 배양세포에 BDF-1 균주에서 추출한 엘리시터를 처리한 것이 처리하지 않은 것보다 약 3배 정도의 높은 GUS 활성 즉, POD 프로모터 활성을 나타내었다.

이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이들 실시예에 의해 본 발명의 범위가 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자들에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: BDF-1 균주로부터 엘리시터의 추출 실시예 1: BDF-1 균주로부터 엘리시터의 추출

BDF-1 엘리시터 용액은 Doke와 Tomiyama법(Doke, N. and Tomiyama, K Physiol. Plant. Pathol. 16:169-176)의 방법에 따라 제조하였다.

실시예 2: POD 프로모터로 형질전환된 담배세포에 엘리시터 처리 실시예 2: POD 프로모터로 형질전환된 담배세포에 엘리시터 처리

외래 유전자로서 GUS 유전자 및 POD 프로모터를 포함하는 벡터는 생명공학연구소 박상수 박사팀이 개발한 swpa 2 벡터를 사용하였다.

100mL 삼각플라스크에 MS 배지 9mL을 넣은 다음 대수증식기 말기의 전기 형질전환 담배세포 1mL를 접종하고, 실시예 1에서 수득한 엘리시터를 다양한 농도로 처리하여 배양하였다. 배양은 24°C, 100rpm, 햇빛이 들지 않는 조건에서 현탁배양기를 사용하여 배양하였다.

실시예 3: POD 프로모터 활성 측정 실시예 3: POD 프로모터 활성 측정

실시예 2에 의한 배양액 POD 프로모터 활성을 측정하기 위하여 배양 2, 3 및 5일 경과후에 GUS assay를 수행하였다(도 1). GUS assay는 Joy Wilkinson and Keith Lindsey법(Methods in Biotechnology, 3: 39-47)의 방법을 따랐다.

도 1에서 1314는 POD 프로모터를 삽입한 담배 현탁배양세포, 121은 CaMV35s 프로모터를 삽입한 담배 현탁배양세포이다. cont는 대조구, rose는 엘리시터를 처리한 구이다. 엘리시터를 처리한 1314rose는 엘리시터를 처리하지 않은 1314cont 또는 121rose에 비해 GUS 활성 즉, POD 프로모터 활성이 약 2배 정도 크게 나타났다. 배양 2일, 3일, 5일 각각 GUS 활성을 측정한 결과 3일에서 가장 높은 활성을 보였으며 배양 5일째는 3일째 보다는 활성이 떨어짐을 알 수 있었다.

엘리시터 처리 농도에 따른 GUS 활성을 측정하였다(도 2). 도에서 보이듯이, 엘리시터 농도가 50µg/mL일 때 가장 높은 활성을 보였으며 그 이상의 농도에서는 활성이 떨어짐을 알 수 있었다. 50µg/mL이상의 엘리시터를 처리하면 오히려 세포 성장에 방해를 일으키는 것으로 추측할 수 있다.

본 발명의 엘리시터 및 다른 균주에서 추출한 엘리시터 처리에 따른 GUS 활성을 측정하여 비교하였다(도 3). 도 3에 보이듯이 다른 엘리시터에 비해 본 발명에 의한 엘리시터의 활성이 보다 높음을 확인하였다. 전체적으로 121세포보다 1314세포에서 GUS 활성이 보다 크게 나타났다. 도 3에서 HWC는 파이소라 인페스탄스(*Phythora infestance*)로부터, BDF-K는 케피어(*Kefir*)로부터, BDF-32는 피씨움 울티무(*Pythium ultimum*)으로부터 수득한 것이며, 처리농도는 $10\mu\text{g}/\text{Ml}$ 이었다.

본 발명의 엘리시터를 POD 프로모터를 포함하는 벡터에 의해 형질전환된 담배 세포에 처리한 결과 POD 프로모터 활성이 증가함을 확인하였고, 따라서 본 발명의 엘리시터가 POD 프로모터 발현시스템의 유도제로 효과가 있음을 확인하였다.

발명의 효과

본 발명은 장미에 공생 또는 기생하는 균주인 BDF-1 균주로부터 추출한 엘리시터를 POD 프로모터의 발현시스템 유도제로서 이용하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의한 엘리시터를 이용함으로써 POD 프로모터에 삽입한 유용한 단백질 유전자 산물의 생산을 증가시킬 수 있어, 고수율, 저비용으로 의약단백질 등과 같은 유용물질을 생산할 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

BDF-1(KCTC 1002BP) 균주로부터 추출한 엘리시터를 주요성분으로 POD 프로모터의 발현시스템 유도제.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

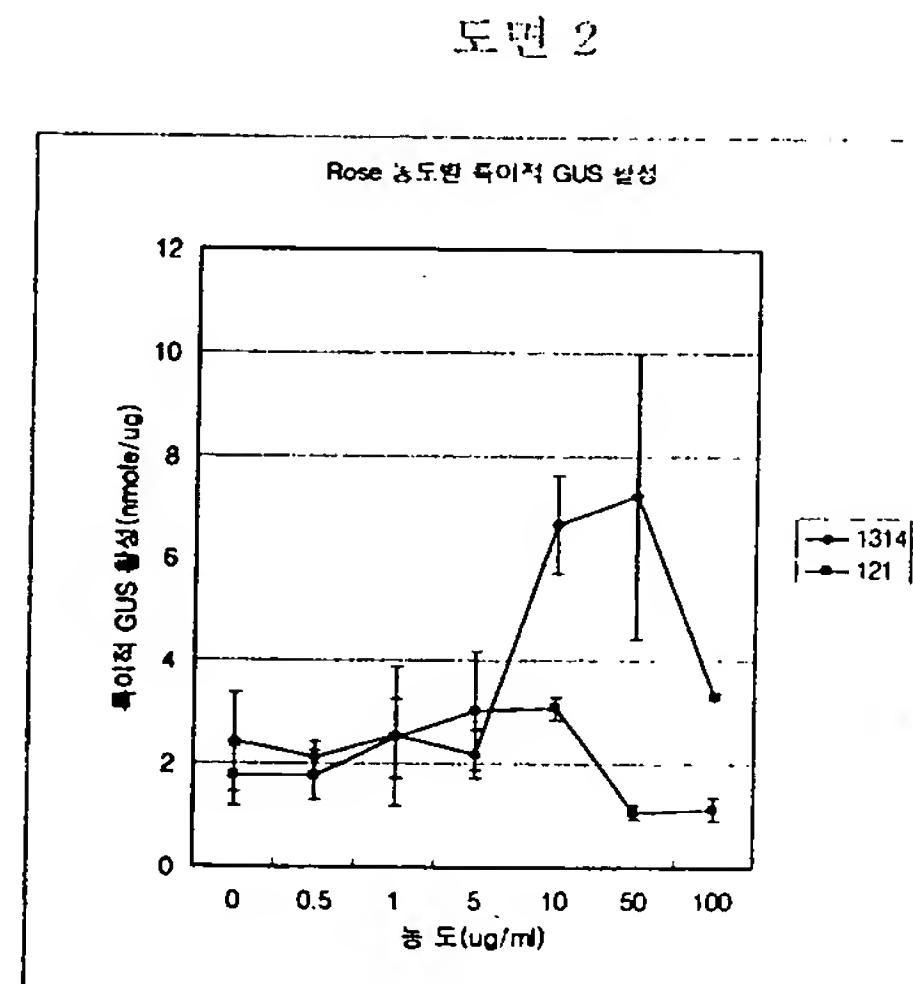
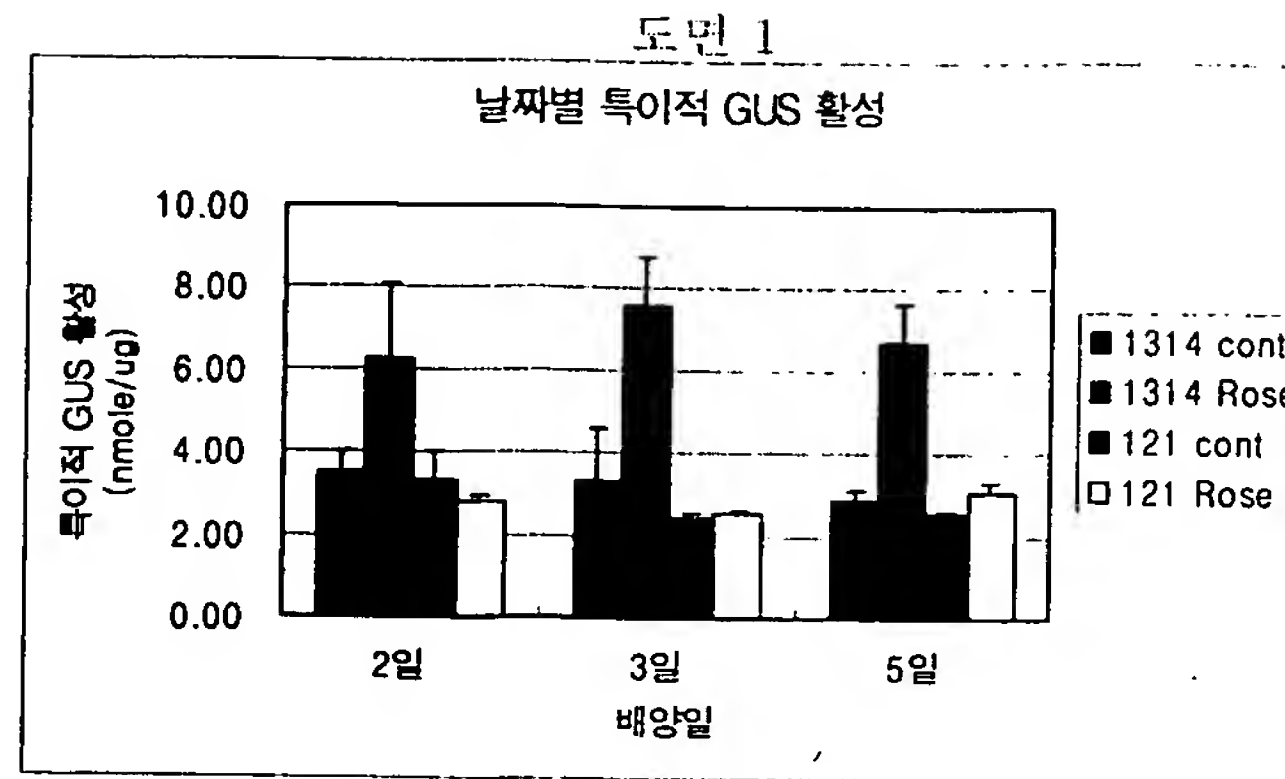
상기 엘리시터는 BDF-1 균주의 균체벽 추출물인 것을 특징으로 하는 POD 프로모터의 발현시스템 유도제.

청구항 3.

제 1 항에 있어서,

상기 POD 프로모터는 고구마 유래인 것을 특징으로 하는 POD 프로모터의 발현시스템 유도제.

-도면



도면 3

